この使用説明書をよく読んでから使用してください

研究用試薬

スイフトジーン® クドア「カイノス」

【はじめに】

Kudoa septempunctata (以下、クドア) は、ヒラメの筋肉に寄生する粘液胞子虫類の一種で、大きさは直径約0.01 mmであるため、ヒラメへの寄生の有無を肉眼で確認することは困難です。クドアで汚染されたヒラメを摂食すると2～3時間の潜伏期間の後に下痢や嘔吐といった食中毒症状を発症します。食中毒事例からクドア食中毒の最小発症胞子数は7200万個と推定されており、厚生労働省は胞子数100万個/g以上のクドアに寄生された生食用生鮮ヒラメを、食品衛生法第6条違反として取り扱っています。

本製品は、ヒラメに寄生したクドアの遺伝子を検出するキットで、食品の安全確保推進研究事業で妥当性が評価されています。

【全般的な注意】

1) 本製品は研究用試薬です。診療上の診断に用いることはできません。
2) 使用説明書に記載以外の使用方法については保証を致しません。
3) 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。
4) 本製品は核酸 (RNA) を対象とし、大量のRNAを生成し、検出する試薬です。検体や増幅産物の取り扱いを誤ると検査結果に大きく影響しますので、遺伝子操作に関する一般的な注意をよく理解して実施してください。

【形状・構造等(キットの構成)】

1. 抽出・増幅試薬
   1) 核酸抽出試液
   2) NASBA試薬 (NASBA Reaction Buffer)：
      dNTPs, NTPs
   3) プライマー溶液：
      クドア特異的プライマー、ICテンプレート、ICプライマー
   4) NASBA酵素試薬 (NASBA Enzyme)：
      AMV-RT, RNase H, T7 RNA polymerase
   5) NASBA酵素溶解液
   6) 反応用チューブ
2. 検出試薬
   1) 検出ストリップ
   2) 展開液
   3) プレートシール

【測定原理】

1. 原理

本製品はNASBA法[1] (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) による核酸増幅及び核酸クロマトグラフィー[2]を用いて、クドアに特異的なRNAを検出します。

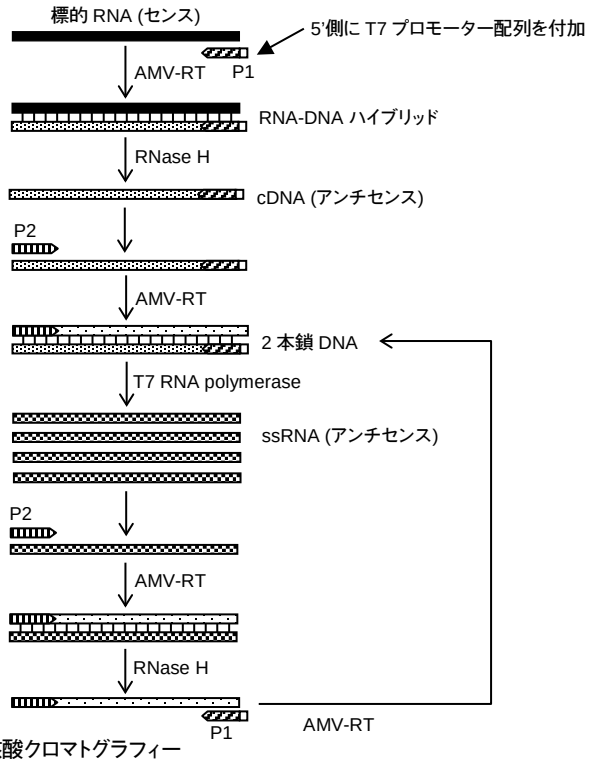
A. 抽出

核酸抽出試液によってヒラメ筋肉に存在するクドアからNASBA法で増幅可能な核酸を得ます。

B. 核酸増幅法

クドアに特異的なRNAを鋳型とし、45°Cの一定温度で、3種類の酵素 (逆転写酵素 (AMV-RT)、リボヌクレアーゼH (RNase H)、RNAポリメラーゼ (T7 RNA polymerase))、2種類のプライマー(リバース (P1)、フォワード (P2)) および基質の存在下で、途中合成される二本鎖DNAを介し、鋳型に相補的な配列の1本鎖RNA (ssRNA) を増幅します (右上図参照)。

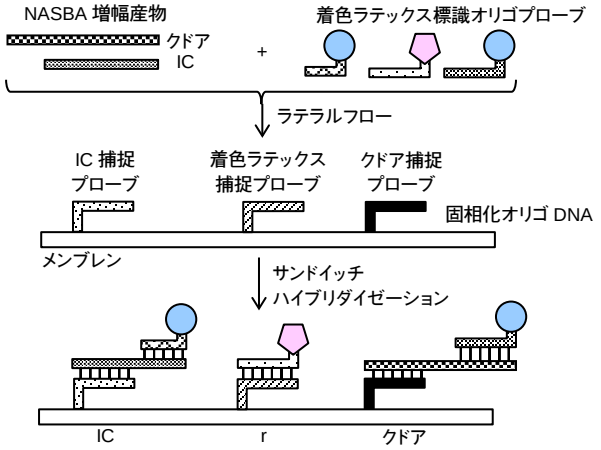
プライマー溶液にはインターナルコントロール (IC) のテンプレート及びプライマーが含まれており、クドアの標的RNAと共に増幅されます。



C. 核酸クロマトグラフィー

NASBA増幅産物が着色ラテックス標識オリゴプローブ及びメンブレン上の捕捉プローブ (固相化オリゴDNA) とサンドイッチハイブリダイゼーションすることにより、メンブレン上に着色ラテックスのラインが形成されます (下図参照)。このラインを目視で確認することにより、検体中のクドアの存在有無を判定します。

増幅反応の成否を判定するためにクドアの標的RNAと共に増幅されたICの検出ラインは、核酸クロマトグラフィーにおいて、クドアの検出ラインとは異なる位置で検出され、増幅反応が阻害された場合、ICとクドアのラインは共に検出されません。



2. 特徴
   1) 食中毒の原因となる*Kudoa septempunctata*を特異的に検出します。
   2) ヒラメ試料からの核酸抽出、標的RNAの増幅、クドアを検出するまでに要する時間は1時間以内です。
   3) インターナルコントロールを共増幅することにより、増幅阻害による偽陰性を防止します。

【操作上の注意】

1. 測定試料の採取方法
   1) ヒラメ試料はあらかじめ細かくカットし、PBSと共にストマフィルターに入れて押しつぶし、乳剤を作製してください。

      例：ヒラメ筋肉15 gを30等分にカットし、PBS 15 mL と共にストマフィルターへ入れ、よく手で押しつぶします(図1)。ストマフィルターの不織物で固定物を除き、ろ過液 (図2) を乳剤として使用します。

      図1

      図2

2. その他
   1) RNase等による核酸分解防止のため、乳剤調製を含めた操作全般にわたって必ずマスク及びグローブを着用してください。
   2) 検出操作は20～30°Cの室内温度で実施してください。

【用法・用量(操作法)】

1. 試薬の調製方法
   1) NASBA反応溶液：
      NASBA試薬にプライマー溶液 55 μLを加え、直ちにボルテックスミキサーを用いて十分に溶解してください。調製後は、氷上に置かずに常温で静置してください。
      溶解後は遠心しないでください。チューブ壁面に液滴がある場合は手でチューブを振り落とす程度にしてください。
      調製後に長期保存する場合は、−70°C以下で保存してください。

   2) NASBA酵素液：
      NASBA酵素試薬をスピンダウンした後、NASBA酵素溶解液 30 μLを加え、10秒程度待ってからタッピングにより溶解してください。
      ボルテックスミキサー等による激しい混和は酵素が失活するため、行わないでください。
      調製後に長期保存する場合は、−70°C以下で保存してください。

   3) 核酸抽出試液、検出ストリップ、展開液：
      室内温度 (20～30°C) に戻した後、そのまま使用してください。
      検出ストリップは検出操作の直前に開封してください。

2. 必要な器具・器材・試料等
   1) マイクロピペット (10, 200, 1000 μL)、フィルターチップ
   2) 1.5 mL チューブ
   3) ヒートブロック (45°C)
   4) ボルテックスミキサー
   5) 小型卓上遠心機
   6) ストマフィルター
   7) PBS

3. 操作法
   A. 核酸抽出
      1) 核酸抽出試液 500 μLを1.5 mLチューブに取り、ストマフィルター等で作成した乳剤 100 μLを加え、ピペッティングを10回行ってから、使用するまで氷上に静置してください。
      2) 1) で調製した混合液をNASBA反応に使用します。

         注1：核酸抽出試液と乳剤を混合した後、遠心操作は行わないでください。

   B. NASBA反応
      1) NASBA反応溶液およびNASBA酵素液を調製します。
         (調製方法は「1. 試薬の調製方法」を参照)
      2) 付属の反応用チューブにNASBA反応溶液 5 μLを分注し、常温で静置します。
      3) 反応用チューブにA.2) で得られた混合液 2.5 μLを分注し、10回ピペッティングします。

         注2：反応用チューブ内で液が散った場合は小型卓上遠心機でスピンダウンしてください。
         衝撃によるRNA分解を抑えるため、ボルテックスミキサー等による混和は行わないでください。

      4) 45°Cのヒートブロックで1分間加温します。
      5) 45°Cのヒートブロック上で反応用チューブ内の反応液に直接NASBA酵素液 2.5 μLを添加し、5回ピペッティングして混合します。そのまま45°Cのヒートブロックで30分間加温しまてください。

         注3：NASBA酵素液を添加後最初の5分間は、NASBA反応の重要な過程であるため、遠心など温度低下を招く操作は行わないでください。

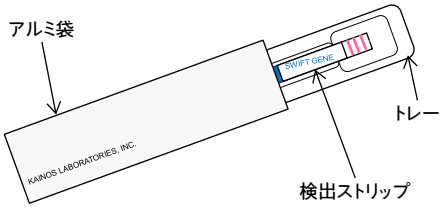
      6) 反応終了後、直ちに検出操作に移ります(「C. 核酸クロマトグラフィー」を参照)。

         注4：NASBA増幅産物を保存する場合、増幅反応終了後の反応用チューブを−70°C以下で保存してください。検出操作前に常温に戻してから使用してください。

C. 核酸クロマトグラフィー

1) 検出ストリップは室内温度（20～30°C）に戻してからアルミ袋を開封し、検出ストリップをトレーごと取り出した後、さらにトレーから取り出します。

注5：アルミ袋の開封は検出操作の直前に行ってください。



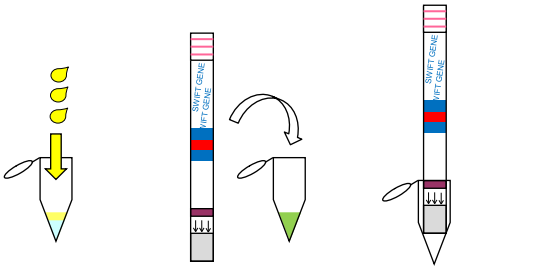
2) 増幅反応終了後の反応用チューブ（NASBA増幅産物）に展開液を3滴（約90 μL）加えます。

3) 反応用チューブに検出ストリップを矢印が下になるように挿入し、検出ストリップの先端を展開液に浸します。

注6：反応用チューブの底に強く押しつけないように注意し、検出ストリップの下端がチューブの底にあたるまで挿入してください。

注7：検出ストリップを入れた際、矢印の下端ラインを超えて展開液に浸してしまうと展開不良を起こすことがあるので注意してください。

4) 反応用チューブにストリップを挿入してから15分後に判定します（【測定結果の判定方法】を参照）。



1) 展開液を 3 滴加える　2) 検出ストリップ挿入　3) 挿入してから 15 分後に判定

【測定結果の判定法】

1. 判定法

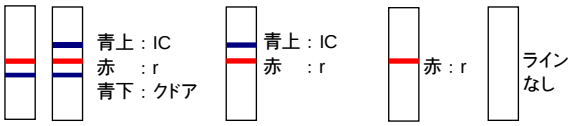
以下のラインの有無により判定してください。

ライン	色・位置	判定内容
ICライン	青上	核酸増幅の成否
rライン	赤	検出フローの確認
クドアライン	青下	陽性・陰性の確認

1) クドア陽性 ：
rライン（赤）の下にクドアライン（青下）が認められる

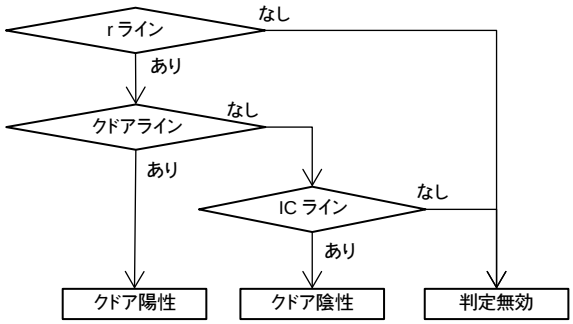
2) クドア陰性：
rライン（赤）の上にICライン（青上）が認められ、下にクドアライン（青下）が認められない

3) 判定無効：
rライン（赤）のみ認められる（増幅反応不成立）
rライン（赤）が認められない（展開不良）



1) クドア陽性　2) クドア陰性　3) 判定無効

判定フロー：



2. 判定上の注意

1) 判定は20分以内に行ってください。
2) 検出ストリップを挿入してから15分経過後、rライン（赤）が認められない場合、再検査してください。
3) メンブレン上にラテックスの着色が全体的に残っていても、rライン（赤）が認められていれば核酸クロマトグラフィーの反応は有効です。
4) クドア強度陽性の場合、ICライン（青上）が薄くなることがあります。rライン（赤）とその下のクドアライン（青下）が認められる場合は、クドア陽性と判断してください。
5) ICライン（青上）およびクドアライン（青下）が認められない（rライン（赤）のみ認められる）場合は、検体中の共存物質等により核酸増幅反応が正常に行われていないことを示します。
6) 検体により、検体中の目的成分以外の物質との反応や妨害反応を生じることがあります。結果に疑問がある場合は、再検査や他の検査方法により確認してください。
7) 検査結果を保存する場合は、検出ストリップをトレーに戻し、添付のプレートシールで密閉保存してください。

【性能】

1. 性能
   1) 最小検出感度[3)]
   3.3×10^2 個/g

   2) 交差反応性
   ヒラメに寄生する以下のクドア種について本製品を用いて試験を行った結果、すべて陰性を示し交差反応性は認められませんでした。
   ・ *Kudoa lateolabracis*
   ・ *Kudoa thyrsites*

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意
   1) 検査にあたっては使い捨て手袋を着用してください。
   2) 試薬が誤って眼や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。
   3) 本製品にはアジ化ナトリウムが含有されています。誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当等を受けてください。

2. 使用上の注意
   1) 各試薬は保存温度を厳守してください。調製した試薬の保存にあたっては、コンタミネーション防止に注意してください。
   2) 増幅反応に使用する試液は2種類ありますので、調製時及び操作時に取り違えないように注意してください。
   3) NASBA増幅産物は−70°C以下 で保存してください。
   4) ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。
   5) ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。

3. 廃棄上の注意
   1) 検査終了後の検出ストリップや増幅産物は、キャリーオーバーコンタミネーションを起こす可能性がありますのですぐに廃棄してください。
   2) 本製品を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。
   3) 検査に使用した器具や試薬等は感染の危険があるものとして適切に処理してください。
   4) 本製品が漏出又は飛散した場合は、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。
   5) 本製品にはアジ化ナトリウムが含有されています。アジ化ナトリウムは鉛、銅等と反応して爆発性の高いアジ化金属を形成することがあるので、廃液等は大量の水で流すよう注意してください。
   6) 本製品の容器等は他の目的に転用しないでください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 ： 2〜10°C
有効期間 ： 12ヵ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

【包装単位】

製品名		管理コード	包装
抽出試薬 増幅試薬	核酸抽出試液 NASBA試薬 プライマー溶液 NASBA酵素試薬 NASBA酵素溶解液 反応用チューブ	GP-7100	5 mL× 2 10回分× 2 110 μL× 1 10回分× 2 60 μL× 1 20本
検出試薬	検出ストリップ 展開液 プレートシール	GP-7200	1本× 20 2 mL× 1 20枚

【主要文献】

1) Compton J ： Nature, 350：91-92 (1991)
2) 宇治家武史 ： 臨床化学, 36：19-24 (2007)
3) Sugita-Konishi Y, et al. ： Jpn J Infect Dis, 68, 2：145–147 (2015)

【問い合わせ先】

株式会社カイノス 学術部
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18
☎ 03 (3816) 4480　　FAX 03 (3816) 6544

製造販売元
株式会社カイノス
〒113-0033　東京都文京区本郷2-38-18　☎ 03 (3816) 4485